

## GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VARLIĞINI SAPTAMADA FARKLI YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Mehmet KÖROĞLU, Mehmet S. TEKEREKOĞLU, Bengül DURMAZ,  
Rıza DURMAZ

### ÖZET

Bir yıllık sürede klinik örneklerden izole edilen toplam 701 Gram negatif çomakta genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) oluşturma, çift disk sinerji, 5 µg'lık seftazidim diski ve GSBL belirleyici antibiyotiklerle disk difüzyon testleri gibi tarama yöntemleri ile araştırılmıştır. Bu testlerle pozitif veya şüpheli sonuç alınan 80 suş için agar dilüsyon ve E test gibi doğrulama yöntemleri uygulanmıştır. GSBL tanımlamada referans olan agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırıldığında; diğer testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü, E test ile % 75 ve % 98; çift disk sinerji testi ile % 75 ve % 96; 5 µg'lık seftazidim diski ile % 81 ve % 58; GSBL belirleyici antibiyotiklerin kullanımı ile % 56 ve % 79 olarak bulunmuştur. GSBL üretimi, *Klebsiella* türlerinde % 49, *Citrobacter* türlerinde % 15, *Enterobacter* türlerinde % 5, *E. coli*'lerde % 1 olarak bulunmuştur. Özgüllüğü ve duyarlılığı birlikte değerlendirildiğinde ucuzluğu ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle, çift disk sinerji testinin GSBL varlığını belirlemede tarama testi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

### SUMMARY

*Comparison of different methods for determination of extended spectrum beta-lactamase production in Gram negative bacilli.*

Sevenhundred and one Gram negative bacilli isolated in one year period were screened for ESBL production using preliminary screening methods such as double disk synergy, ceftazidime disk (5 µg) and marker antibiotics with disk diffusion methods. The confirmation tests with agar dilution and E test were performed for 80 isolates determined to be suspicious or positive with ESBL screening tests. In comparison to reference agar dilution method, the sensitivity and specificity of the other tests were 75% and 98% for E test; 75% and 96% for double disk synergy test; 81% and 58% for 5 µg ceftazidime disk and 56% and 79% for marker antibiotics. The resistance due to ESBL were found to be 49% for *Klebsiella* spp, 15% for *Citrobacter* spp, 5% for *Enterobacter* spp and 1% for *E. coli*. The sensitivity and specificity of the double disk synergy method make it a useful tool for the detection of ESBL production. The method is cheap and user-friendly for routine usage.

### GİRİŞ

Antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi, sıklıkla enzimler yolu ile ilacın inaktive edilmesi ve/veya değişikliğe uğratılması şeklinde olmaktadır. Buna en iyi örnek β-laktamazlar ile

## BULGULAR

Çift disk sinerji, 5 µg seftazidim diski ve belirleyici antibiyotikler kullanılarak GSBL yönünden taranan 701 Gram negatif çomak arasından 80'inde GSBL'a bağlı direnç yönünden pozitif veya şüpheli sonuç alınmıştır. Bu 80 suştan 32'sinde (% 40) agar dilüsyon testi ile, 25'inde (% 31) E test ile, 26'sında (% 32) çift disk sinerji ile, 46'sında (% 58) 5 µg'lık seftazidim diski ile ve 28'inde (% 35) belirleyici antibiyotik duyarlılıklarına göre GSBL varlığı saptanmıştır.

Agar dilüsyon yöntemi referans test olarak kabul edildiğinde; karşılaştırılan testlerin duyarlılıkları; hem E test, hem de çift disk sinerji testi ile % 75, 5 µg'lık CAZ diski ile % 81, GSBL belirleyici antibiyotikler ile % 56, özgülükleri ise sırasıyla; % 98, % 96, % 58, % 79 olarak bulunmuştur. Agar dilüsyon testi ile E test, çift disk sinerji, 5 µg'lık seftazidim diski yöntemleri ile GSBL belirleyici antibiyotikler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Tablo 1).

Tablo 1. Referans test olan agar dilüsyon ile diğer yöntemlerin karşılaştırılması.

Yöntemler	Agar dilüsyon		Toplam	Duyarlılık (%)	Özgülük (%)	
	+	-				
E test ESBL	+	24	1	25	75	98
	-	8	47	55		
Çift disk sinerji	+	24	2	26	75	96
	-	8	46	54		
5 µg CAZ diski	+	26	20	46	81	58
	-	6	28	34		
GSBL belirleyici antibiyotiklerle	+	18	10	28	56	79
	-	14	38	52		

Referans yöntem olan agar dilüsyon ile GSBL saptanan 32 suşun, izole edilen toplam 701 Gram negatif bakteri ile servis ve poliklinik hastaları arasındaki dağılımları tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. GSBL pozitifliğinin bakteri türlerine ve servis/poliklinik suşlarına göre dağılımı.

Bakteri	İzole edildiği yer	n	GSBL (+)	%
E.coli	Servis	113	3	3
	Poliklinik	417	3	1
Klebsiella spp.	Servis	28	18	69
	Poliklinik	15	2	13
Enterobacter spp.	Servis	52	4	8
	Poliklinik	30	0	0
Pseudomonas spp.	Servis	18	0	0
	Poliklinik	15	0	0
Citrobacter spp.	Servis	8	1	12
	Poliklinik	5	1	20
Toplam		701	32	5

## TARTIŞMA

Bugüne kadar GSBL'ların güvenilir bir şekilde saptanabilmesi amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. In-vitro testlerle tüm GSBL'lar saptanamamaktadır. GSBL oluşturan suşların üçüncü kuşak sefalosporin ve monobaktam MİK değerlerinde yükselme olmakla birlikte, bu suşlar rutin antibiyogramda sıklıkla duyarlı bulunabilmektedir (4,13,20,21). Çünkü düşük düzeyde direnç oluşturan GSBL enzimi oluşturan suşların disk difüzyon yöntemiyle saptanması oldukça zordur. Çalışmamızda disk difüzyon testinde belirleyici antibiyotikler kullanıldığında GSBL pozitif suşların ancak % 56'sı saptanmış ve bu yöntemin özgüllüğü % 79 bulunmuştur (Tablo 1). Diğer testlerle GSBL saptadığımız suşlardan % 27'si sefoksitin yanında üçüncü kuşak sefalosporinlere ve aztreonama duyarlı bulunmuştur. Bu bulgular aynı yöntemi kullanan araştırmacıların elde ettikleri sonuçlarla benzerlik göstermektedir (10,26,34). Jacoby ve Han (10). GSBL sentezleyen bakterilerin 5 µg'lık seftazidim diski ile yüksek duyarlılık ve özgüllükte saptanabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar GSBL üretimini saptayabilmek için seftazidim inhibisyon zon çapı sınırını 17 mm kabul ettiklerinde duyarlılığı % 96, 20 mm kabul ettiklerinde % 100 bulunmuşlardır. Çalışmamızda 17 mm kriter olarak alındığında, bu testin duyarlılığı % 81, özgüllüğü % 58 olarak saptanmıştır (Tablo 1). Yirmi milimetre kriterine göre ise duyarlılık % 94 bulunmuş, özgüllük ise % 50'nin altına düşmüştür. GSBL belirleyici antibiyotiklerle antibiyogramda saptanamayan düşük düzeyde dirençten sorumlu GSBL'ları saptayabilmesi bu yöntemin bir avantajı sayılabilir. Nitekim agar dilüsyon yöntemi ile elde ettiğimiz bulgulara göre GSBL pozitif olarak saptanan 32 suşdan 9'u (% 27) standart seftazidim diskine (30 µg) duyarlı iken, 5 µg'lık seftazidim diski ile yalnızca 4'ü (% 12) duyarlı bulunmuştur.

GSBL üretimini saptamak amacıyla klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri de çift disk sinerji testidir. Çalışmamızda bu testin duyarlılığı % 75 gibi düşük bir oranda olmakla birlikte özgüllüğü % 96 olarak yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda bu testin duyarlılığı % 79-90 arasında kaydedilmiştir (1,2,3,34,35). Bu test ucuz ve kullanım kolaylığı gibi avantajlara sahip olması nedeniyle rutin taramalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

GSBL üreten bakterilerin saptanmasında klavulanik asit kombinasyonlu agar dilüsyon metodu referans metod olarak önerilmektedir (3,12,18). Diğer yöntemlerle GSBL oluşturmaları muhtemel, sefoksitine duyarlı iken seftazidime ve aztreonama dirençli bulunan üç suşda ise agar dilüsyon testinde seftazidim konsantrasyonu 32 µg/ml'den başladığı için klavulanatin sinerjik etkisini saptamak mümkün olmamıştır. Agar dilüsyon metodu duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksek olmasına rağmen masraflı ve zaman alıcı bir yöntem olması nedeniyle rutin taramalardan ziyade, doğrulama testi olarak kullanılmalıdır.

GSBL salgılayan mikroorganizmaları saptamak amacıyla geliştirilmiş olan E test'in duyarlılığı % 75, özgüllüğü % 98 bulunmuştur (Tablo 1). Literatürde bildirilen duyarlılık oranları % 52 ile % 100 arasında değişmektedir (3,22,34). E test ile, çift disk sinerji, 5 µg seftazidim diski ve GSBL belirleyici antibiyotik kullanımı yöntemlerinin sonuçlarında istatistiksel olarak fark bulunmadığından birbirlerinin yerine kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Agar dilüsyona göre diğer testlerin duyarlılık ve özgüllükleri birlikte ele alındığında, GSBL üretiminin saptanmasında en iyi yöntemlerin E test ve çift disk sinerji testleri olduğu gözlenmiştir.

İncelediğimiz bakteriler arasında en yüksek GSBL pozitiflik oranı % 49 ile *Klebsiella*'larda saptanmıştır. Yatan hastalardan izole edilen *Klebsiella* suşlarında ise GSBL pozitifliği daha yüksek oranda (% 69) bulunmuştur. Bazı araştırmacılar GSBL'ların *Klebsiella*'larda daha yaygın olarak görülmesini bu mikroorganizmaların deri ve yüzeylede diğer enterik bakterilere göre daha uzun süre canlı kalabilmeleri ile açıklamaktadırlar (7). Nicoletti ve Pecile (21) GSBL'ların en sık *Klebsiella*'larda (% 36), daha sonra da *Enterobacter*, *Serratia* ve *Proteus* türlerinde bulunduğunu ve yoğun bakım izolatları arasında en yüksek GSBL pozitifliğini *Serratia* türlerinde (% 83) saptadıklarını bildirmişlerdir. Ülkemizde hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella*'larda % 40-100 arasında değişen GSBL oranları bildirilmiştir (2,4,6,13,14,23,35). *E.coli*'lerde % 0-32 (4,8,13,14,29,31), *Enterobacter* türlerinde % 4-44 (11,13,14,29), *Citrobacter* türlerinde % 0-6 (5,13), *Pseudomonas*'larda ise % 0-18 (13,32) oranları bildirilmiştir.

Sonuç olarak özellikle hastane kaynaklı izolatlarda GSBL üretiminin giderek arttığı görülmektedir. Bu suşların rutin antibiyogram testleri ile saptanması mümkün olmadığından Gram negatif çomaklar, GSBL yönünden incelenmelidir. GSBL üretimini saptamak amacıyla agar dilüsyon metodu hem duyarlılığı hem de özgüllüğü en iyi olan test olmasına rağmen, çok zaman alması ve bir suş için birden fazla plak gerektirmesi gibi pek çok sebepten rutin olarak kullanımı mümkün olmayan bir yöntemdir. E test ise ülkemiz şartlarına göre oldukça pahalı bir testtir. Beş mikrogramlık seftazidim diski metodunun duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğu bildirilmesine rağmen, bu çalışmada özellikle özgüllüğünün çok düşük bulunması bir dezavantaj olarak görülmektedir. Özgüllüğünün yüksek olması, ucuzluğu, disk difüzyon testi ile yapılan antibiyograma kolayca uygulanabilmesi için avantajları ile çift disk sinerji testinin GSBL varlığını belirlemede en uygun tarama testi olduğu kanısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Akata F: Gram negatif bakterilerde antibiyogramdan enzim tipini tayin etme, XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Özet Kitabı s. 45, Antalya (1996).
- 2- Büyükbaba Ö, Aydın D, Anç Ö: İdrar yolu infeksiyonu etkeni gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi, *Klinik Derg* 9:27 (1996).
- 3- Cormican MG, Marshall SA, Jones RN: Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen, *J Clin Microbiol* 34: 1880 (1996).
- 4- Çokça F, Tekeli E: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların araştırılması, 8. *Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Özet Kitabı s. 747, Antalya (1996).
- 5- Erdenizmenli M, Özgenç O, Urbarlı A, Fidan N, Arı A: Enterobacteriaceae üyesi bakterilerin çeşitli antibiyotiklere direnç oranları ve  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri, "3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik Uygulamalar ve Yenilikler" kitabında s. 338, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul (1997).
- 6- Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N: Hastane infeksiyonlarından soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının  $\beta$ -laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve  $\beta$ -laktamaz tiplerinin incelenmesi, *Mikrobiyol Bül* 30:1 (1996).
- 7- Gür D:  $\beta$ -laktamazlar, *Flora* 2:1 (1997).

- 8- Hoşgör M, Özkan FF, Tünger A, Yapar N, Özinel MA: Gram olumsuz çomaklarda genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların araştırılması, 8. *Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Özet Kitabı s. 708, Antalya (1996).
- 9- Jacoby GA: Genetics of extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:2 (1994).
- 10- Jacoby GA, Han P: Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 34: 908 (1996).
- 11- Kaleli İ, Özen N, Şengül M, Cevahir N, Akşit F: Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmesi, 8. *Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Özet Kitabı s. 718, Antalya (1996).
- 12- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA: Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, *J Clin Microbiol* 32: 691 (1994).
- 13- Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N, Töreci K: Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci ve genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz oluşturma sıklığı, *ANKEM Derg* 11: 108 (1997).
- 14- Kuzucu Ç, Kabakçıoğlu M, Özışık A, Ezen F, Acar NS: Nozokomiyal gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal  $\beta$ -laktamaz saptanması, 8. *Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Özet Kitabı s. 672, Antalya (1996).
- 15- Mathew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW: The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases, *J Gen Microbiol* 88: 169 (1995).
- 16- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA: Mechanism of antibiotics resistance, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*" kitabında s. 212, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 17- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, fourth edition, Approved standard, M7-A4, Villanova (1997).
- 18- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, sixth edition; Approved standard, M2-A6, Villanova, (1997).
- 19- Neu HC: Antimicrobial agents: Role in the prevention and control of nosocomial infections, *Hosp Infect Control* 1: 11 (1996).
- 20- Neurwith C, Siebor E, Lopez J, Pechinot A, Kazmierczak A: Outbreak of TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase to other members of the family Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol* 34: 76 (1996).
- 21- Nicoletti P, Pecile P: Diffusion of Enterobacteria producing enlarged spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) isolated from hospitalized patient in the Careggi Hospital, <http://www.flownet.it/aoc-lab/bat2.html>.
- 22- Nüesch MT, Hacler H, Kayser FH: Detection of genes coding for extended-spectrum SHV  $\beta$ -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 398 (1996).
- 23- Otkun M, Akata F, Karasalihoğlu S, Tatman OM, Orhaner B, Tuğrul M, Dündar V: Yenidoğan servisinde genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz yapan ve gentamisin dışı aminoglikozidlere dirençli *Klebsiella pneumoniae* salgını, *Klinik Derg* 8: 77 (1995).
- 24- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH: Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 17 (1994).

- 25- Philippon A, Labia, R, Jacoby G: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33:1131 (1989).
- 26- Sanderds CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, Knapp C, Mulder R: Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with the Vitek ESBL tests, *J Clin Microbiol* 34: 2997 (1997).
- 27- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: *Biyoistatistik*, s. 106, Özdemir Yayıncılık, Ankara (1993).
- 28- Swenson JM, Hindler JA, Petterson LR: Special tests for detecting antibacterial resistance, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*" kitabında s. 1356, ASM Press, Washington (1995).
- 29- Şimşek S, Taşçıoğlu J, Dağ Z, Çalışkan G, Önder E, Kaya B: Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilmiş gram negatif çomaklarda geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle araştırılması, "3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik Uygulamalar ve Yenilikler" kitabında s. 336, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul (1997).
- 30- Tezcan S: *Epidemioloji (Tıbbi Araştırmalarda Yöntem Bilimi) Metodolojik Araştırmalar*, s. 114, Hacettepe Halk Sağlığı Vakfı, Ankara (1992).
- 31- Tünger A, Dibek MA, Çavuşoğlu C, Aktaş L, Özkan F, Özinel MA: Klebsiella pneumoniae ve E.coli kökenlerinde ESBL sıklığının araştırılması, 8. Klinik Mikrobiyoloji ve Infeksiyon Hastalıkları Kongresi, Özet Kitabı s. 732, Antalya (1996).
- 32- Vahaboğlu H: Antibiyotik duyarlılık testlerinde otomasyon, 7. Klinik Mikrobiyoloji ve Infeksiyon Hastalıkları Kongresi, Özet Kitabı s. 79, Kayseri (1994).
- 33- Vahaboğlu H, Öztürk R, Akbal H, Sarıbaş S, Tansel Ö, Coşkun F: Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, *J Clin Microbiol* 36: 827 (1998).
- 34- Vercauteren E, Deschemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goosens H: Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their prevalence among blood isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. in a Belgian teaching hospital, *J Clin Microbiol* 35: 2191 (1997).
- 35- Yücesoy M, Abacıoğlu YH, Yuluğ N: Nozokomiyal Klebsiella pneumoniae kökenlerinde çoklu antibiyotik direnci, *İnfeksiyon Derg* 10: 225 (1996).